AUS DEM RÖNTGENINSTITUT DER UNIVERSITÄT (DIREKTOR PROF. Dr. A. LIECHTI) UND DEM HALLERIANUM DER UNIVERSITÄT BERN (DIREKTOR PROF. Dr. A. v. MURALT).

Fortgesetzte Untersuchungen über die Röntgenhämolyse, insbesondere ihre Beeinflussung durch Salze

Arbeit unter Leitung von Dr. W. Wilbrandt.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

ERLANGUNG DER WÜRDE EINES DOCTOR MEDICINAE DENTIUM DER UNIVERSITÄT BERN

vorgelegt von

MAX KALBERMATTEN

aus Sion

1942

AUS DEM RÖNTGENINSTITUT DER UNIVERSITÄT (DIREKTOR PROF. Dr. A. LIECHTI) UND DEM HALLERIANUM DER UNIVERSITÄT BERN (DIREKTOR PROF. Dr. A. v. MURALT).

Fortgesetzte Untersuchungen über die Röntgenhämolyse, insbesondere ihre Beeinflussung durch Salze

Arbeit unter Leitung von Dr. W. Wilbrandt.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

ERLANGUNG DER WÜRDE EINES DOCTOR MEDICINAE DENTIUM DER UNIVERSITÄT BERN

vorgelegt von

MAX KALBERMATTEN

aus Sion

Buchdruckerei Schüpfheim A.-G. — 1942

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. A. Liechti von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 4. März 1942.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:
Muralt.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547623_0048

Fortgesetzte Untersuchungen über die Röntgenhämolyse, insbesondere ihre Beeinflussung durch Salze.

Arbeit unter Leitung von Dr. Wilbrandt

vorgelegt von MAX KALBERMATTEN

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage der Wirkung von Röntgenstrahlen auf Erythrocyten. Sie bildet die Fortsetzung einer Dissertation, die K. Burgener in diesem Institut über das gleiche Thema ausgeführt hat. Burgener ging aus von einer Arbeit von Holthusen aus dem Jahr 1922, in der gezeigt wurde, dass nach Röntgenbestrahlung von Schafblut in verdünnten Suspensionen verschiedener Salzlösung eine Hämolyse eintritt, und zwar mit einer Geschwindigkeit, die von der Art des verwendeten Salzes abhängt. Die Ergebnisse von Burgener bestätigten den Eintritt einer Hämolyse und die Abhängigkeit von der Art des verwendeten Salzes, wichen jedoch quantitativ von den Holthusenschen Angaben insofern beträchtlich ab, als die von ihm gefundenen Wirkungen ungleich schwächer waren.

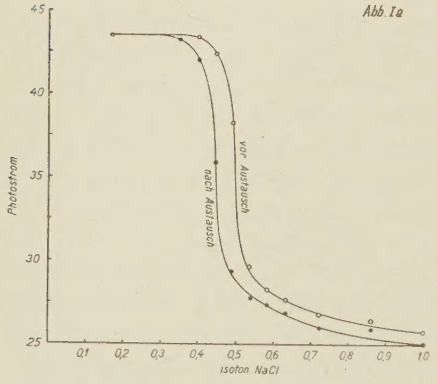
Im Zusammenhang mit der von A. Liechti geäusserten Vermutung, dass die biologische Wirkung der Röntgenstrahlen primär eine Permeabilitätsänderung der Zellen auslösen könnte, untersuchte er nun mit neueren Methoden die Frage, auf welche Weise diese Hämolyse zustande kommt, und stellte dabei fest, dass der Hämolyse eine osmotische Schwellung der Erythrocyten vorausgeht, dass sie also als osmotische Hämolyse betrachtet werden muss, ähnlich etwa der Hämolyse, die in isotonischer Lösung von Glukose, Harnstoff, Glycerin, oder einer andern eindringenden Substanz auftritt. Sie ist offenbar darauf zurückzuführen, dass die Erythrocyten ihre normale Impermeabilität für Kationen verlieren und mehr oder weniger Salz-durchlässig werden. Unter diesen Umständen muss durch den osmotischen Druck des Eiweisses in den Zellen eine osmotische Schwellung zustande kommen, die bei völligem Fehlen eines kolloidosmotischen Druckes aussen nicht zu einem Gleichgewicht führen kann, sondern bis zur Hämolyse fortschreitet.

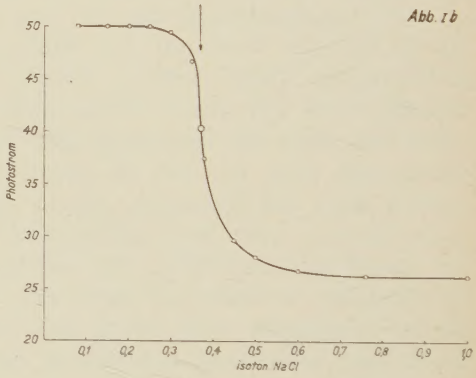
Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun im Anschluss an die Burgener'schen Befunde mit folgenden Fragen: Erstens sollte geprüft werden, ob die durch die Röntgenstrahlen ausgelöste Kationenpermeabilität auf einer Umladung der Membran beruht, oder als allgemeine Steigerung der Ionendurchlässigkeit zu betrachten ist. Im Falle einer Umladung wäre zu erwarten, dass man gleichzeitig mit der Zunahme der Kationendurchlässigkeit eine Abnahme der Permeabilität für Anionen beobachtet. Es sollte daher die Geschwindigkeit des Anionenaustausches an bestrahltem und unbestrahltem Blut quantitativ bestimmt werden. Zweitens sollte die Natur des erwähnten Salzeinflusses auf die Röntgenhämolyse genauer untersucht und die von Holthusen darüber geäusserten Vorstellungen einer experimentellen Prüfung unterzogen werden. Schliesslich sollte geprüft werden, ob der Unterschied zwischen den

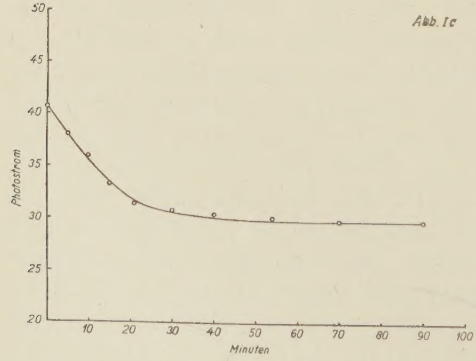
Befunden von Burgener und von Holthusen darauf beruht, dass ersterer mit Schafblut arbeitete, letzterer mit Menschenblut.

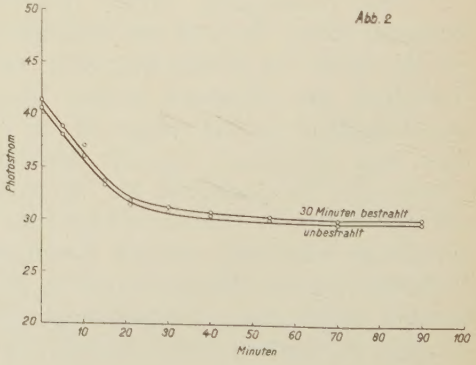
Methodik.

Die Methodik, mit der die osmotische Resistenz des Blutes untersucht wurde, war wie bei Burgener die von Wildbrandt 1938 beschriebene photoelektrische Methode, die in der Arbeit Burgener noch einmal kurz beschrieben wurde. Auch in dieser Arbeit wurde stets mit defibriniertem Blut gearbeitet, das im Eisschrank aufbewahrt wurde. Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur (etwa 20° C) ausgeführt und zwar sowohl die Bestrahlung als die darauf folgende Inkubation und die Resistenzbestimmung. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Metalix-Kontaktröhre. Die Strahlendosis betrug etwa 3000 r pro Minute. Die Methode zur Bestimmung der Geschwindigkeit des Anionenaustausches, die in einer demnächst erscheinenden Arbeit von Wilbrandt ausführlicher beschrieben werden wird, beruht darauf, dass beim Austausch zweiwertiger gegen einwertige Ionen eine Aenderung des osmotischen Druckes im Innern der Zelle auftritt, weil sich aus elektrostatischen Gründen immer je









ein zweiwertiges gegen zwei einwertige Ionen tauschen muss. Bringt man z. B. Erythrocyten, die im Innern als bewegliche Anionen hauptsächlich Chlorid enthalten, in eine isotonische Lösung eines Sulfatsalzes, so muss der eintretende Austausch Sulfat gegen Chlorid ein Absinken des osmotischen Innendruckes und damit eine osmotische Schrumpfung der Zellen zur Folge haben. Diese Schrumpfung kann man durch Untersuchung der osmotischen Resistenz nachweisen und zu einer quantitativen Bestimmung der Austauschgeschwindigkeit benützen. Abb. 1 zeigt dieses Vorgehen. In Abb. 1 a sind die osmotischen Resistenzkurven vor und nach erfolgtem Austausch wiedergegeben. Die durch den Austausch bedingte osmotische Schrumpfung bewirkt, dass zur Auslösung der Hämolyse, die bei einem bestimmten kritischen Volumen der Zellen erfolgt, ein höherer Grad der Hypotonie erforderlich ist, als bei normalem Blut. Die Kurve der Resistenz wird daher nach der Seite der niedrigen Konzentrationen verschoben. Wählt man die photometrische Ablesung bei einer Salzkonzentration im steilen Teil der Kurve als Indikator des Austausches, so genügt es, in regelmässigen Zeitabständen Proben der Blutsuspension in dieser Salzkonzentration zu hämolysieren und den Hämolysegrad photometrisch zu bestimmen. An Abb. 1 b und c ist ein solcher Versuch wiedergegeben. 1 b zeigt die Resistenzkurve vor dem Austausch: die als Test benützte Konzentration ist durch einen grösseren Kreis und einen Pfeil bezeichnet; Abb. 1 c, in der die photometrischen Ablesungen in dieser Konzentration gegen die Zeit aufgetragen sind, zeigt, wie sich der Hämolysegrad in dieser Konzentration im Verlauf eines Austauschversuches ändert.

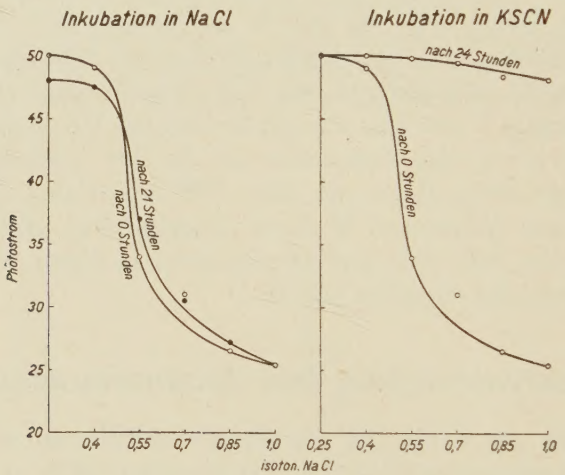
Die Geschwindigkeit des Anionenaustausches.

Zur Prüfung der Frage, ob die Röntgenbestrahlung zu einer Verminderung der Anionenpermeabilität der Erythrocyten führt, wurde folgendermassen vorgegangen. Natives Menschenblut wurde 30 Minuten, wie oben geschildert, der Röntgenbestrahlung ausgesetzt, dann wurden mit gleichen Mengen bestrahlten und unbestrahlten Blutes Suspensionen in isotonischer Kaliumsulfatlösung hergestellt und der Ionenaustausch in diesen Suspensionen wie oben beschrieben, verfolgt. Abb. 2 zeigt einen typischen solchen Versuch. Es ergibt sich, dass die Geschwindigkeit des Austausches in den beiden Suspensionen genau gleich ist. Eine Verminderung der Anionendurchlässigkeit nach der Bestrahlung lässt sich also auf diese Weise nicht nachweisen.

Der Mechanismus der Salzwirkung.

Der Ausgangspunkt für die Untersuchung der Salzwirkung war folgende Beobachtung. Nach Holthusen erhält man eine besonders starke Röntgenhämolyse, wenn man die Suspensionen in isotonischer Kaliumrhodanidlösung

bestrahlt. In einem Versuch mit einer solchen Rhodanidsuspension wurde nun eine erste osmotische Resistenzreihe sofort nach der Bestrahlung und eine zweite nach 24 Stunden angesetzt. Die zweite Resistenzreihe zeigte entsprechend den von Burgener wiedergegebenen Kurven in KNO_3-suspension eine beträchtliche osmotische Schwellung und dementsprechende Verschiebung der Resistenzkurve nach der Seite der hohen Salzkonzentrationen, während in der ersten Resistenzreihe sofort nach der Bestrahlung noch keine solche Verschiebung zu sehen war. Untersuchte man jedoch die erste Reihe nach 24 Stunden noch einmal, so zeigte sich, dass das Blut im Gegensatz zur Rhodanidsuspension, in der es in der gleichen Zeit eine beträchtliche osmotische Schwellung durchgemacht hatte, in den Natriumchloridlösungen der Resistenzreihe sich kaum verändert hatte (Abb. 3). Die Resistenz nach 24 Stunden zeigte etwa das gleiche Aussehen, wie eine Suspension in Natriumchloridlösung

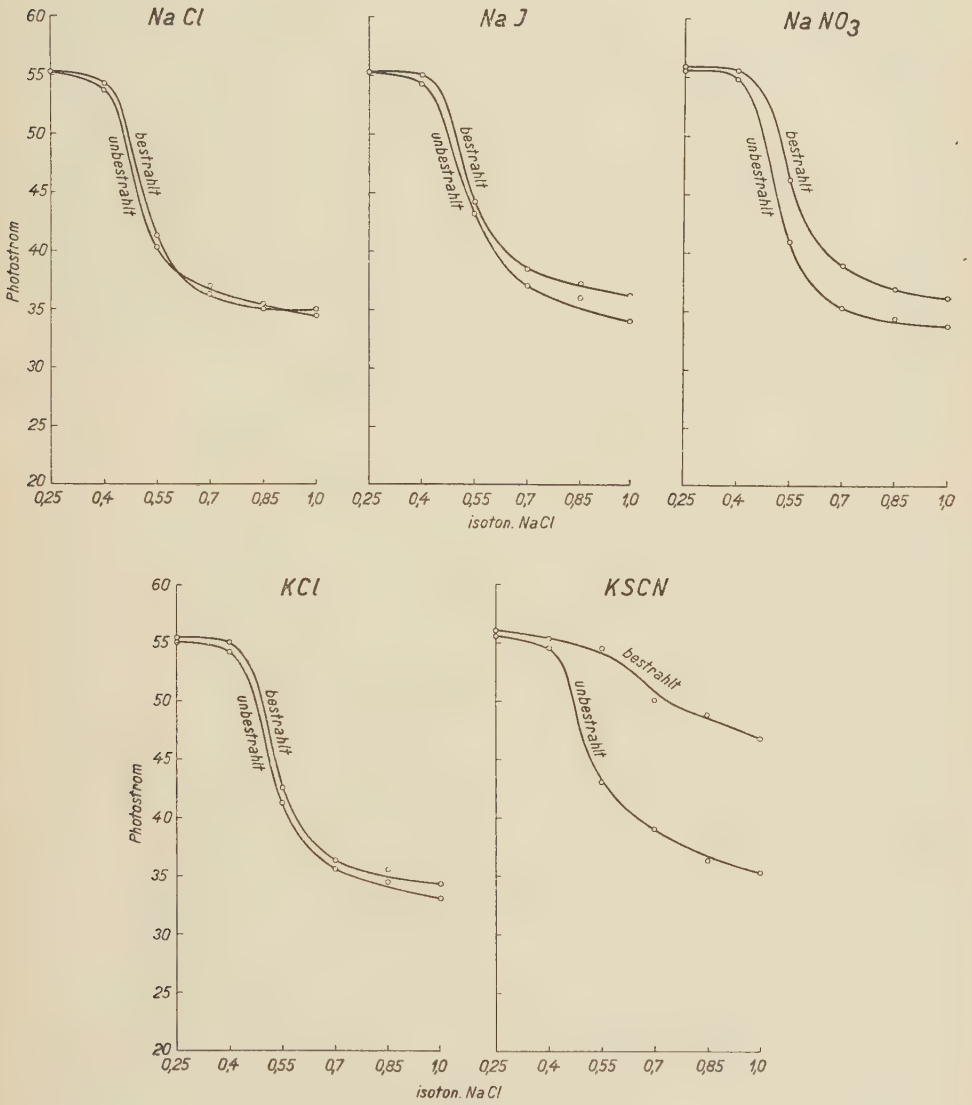


24 Stunden nach der Bestrahlung. Da der hauptsächlichste Unterschied zwischen den beiden Resistenzen nach 24 Stunden darin bestand, dass das eine Blut in Rhodanidlösung, das andere in den Natriumchloridlösungen aufbewahrt worden war, lag die Vermutung nahe, dass die Wirkung des Rhodanids gar nicht während der Bestrahlung einsetzt, sondern in der Nachperiode. Da die Kochsalzsuspensionen der Resistenzreihe sich jedoch von der Rhodanidsuspension auch noch in der Salzkonzentration und in der Blutkonzentration unterschied, wurde die Frage noch einmal systematisch geprüft.

Dabei wurde folgendermassen vorgegangen. Das Blut wurde nicht in Suspension, sondern als Vollblut bestrahlt und erst nach der Bestrahlung auf verschiedene isotonische Salzlösungen verteilt, in diesen Lösungen 24 Stunden aufbewahrt und dann auf seine osmotische Resistenz geprüft. Dabei zeigte sich in der Tat, dass zwischen den Suspensionen in den verschiedenen Salzlösungen

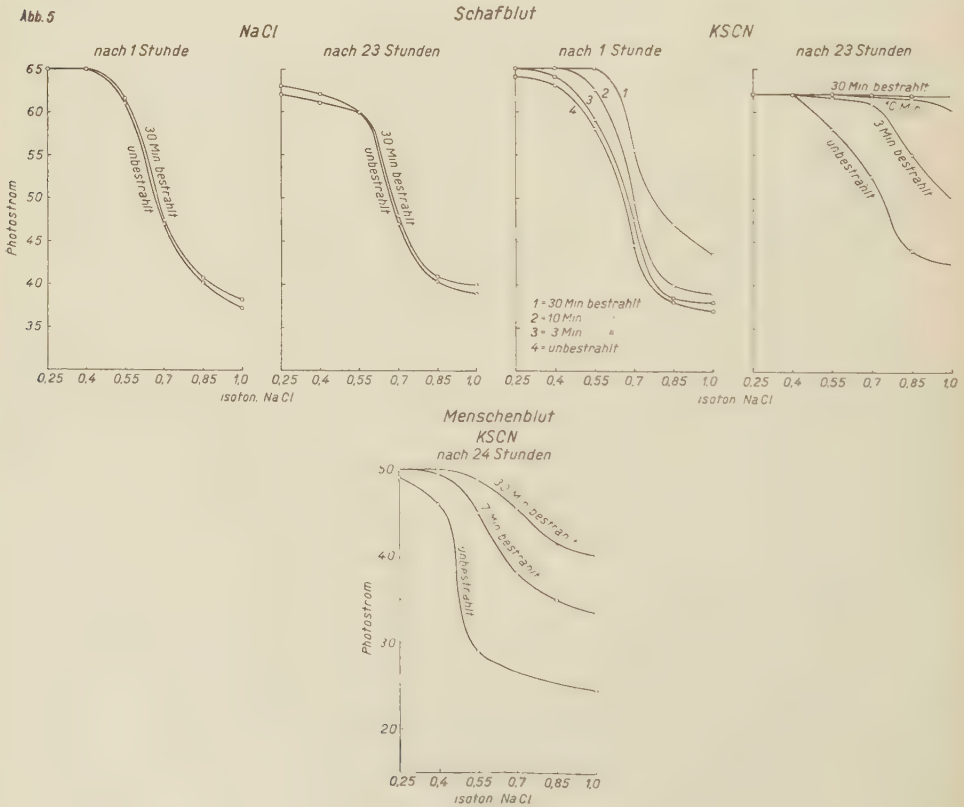
qualitativ derselbe Unterschied zu beobachten ist, wie wenn das Blut in diesen Suspensionen bestrahlt worden wäre. Abb. 4 zeigt dieses Verhalten. Es geht aus ihr hervor, dass die verwendeten Salze in folgender Reihenfolge das Entstehen der Hämolyse begünstigen:

Abb. 4



NaC1 NaI $NaNo_3$
K C1 KSCN
NaC1 KCL

Bezüglich der Anionen entspricht die Reihe ungefähr der Iyotropen Hofmeisterschen Ionenreihe. Das ist im wesentlichen die gleiche Reihenfolge, die Holthusen fand, der das Blut vor der Bestrahlung auf die verschiedenen Salzlösungen verteilte und dann die Suspension bestrahlte. Von Kationen sind bisher nur Kalium und Natrium untersucht worden. In Natriumsalzsuspensionen ist die Wirkung schwächer als in Kaliumsuspensionen. Man kann daraus aber zunächst noch nicht schliessen, dass Kalium und Natrium verschiedene Wirkung auf die Permeabilitätsänderung ausüben, sondern der Unterschied rührt offenbar in erster Linie daher, dass Kalium bei gleicher Permeabilität der Membran leichter eindringt als Natrium. Bei kationenpermeablen Zellen ist das durchwegs der Fall, soweit es sich um passive Permeabilität handelt. Der Einfluss der Kationen auf die Permeabilitätsänderung wird in einer späteren Arbeit noch genauer untersucht werden. Bei den in Abb. 4 wiedergegebenen Versuchen zeigte sich ferner, dass auch in KS CN-suspensionen mit unbestrahltem Blut eine Resistenzverschiebung in der gleichen Richtung wie bei bestrahltem Blut eintritt, wenn auch in viel geringerem Masse. Kurven, die das belegen, werden in einer späteren Arbeit wiedergegeben werden. Auf die Bedeutung dieses Befundes wird in der Diskussion einzugehen sein.



Die Röntgenhämolyse des Schafblutes.

Da Holthusen in seinen Versuchen, in denen er sehr viel stärkere Hämolyse erhielt als wir in den unsrigen, Schafblut verwendet hatte, sollte geprüft werden, ob der Unterschied vielleicht auf der höheren Empfindlichkeit dieser Blutart gegenüber Röntgenstrahlen beruht. Es wurden daher dieselben Versuche, wie sie in den bisherigen Untersuchungen mit Menschenblut angestellt wurden, mit Schafblut wiederholt. Abb. 5 zeigt das Ergebnis der Röntgenbestrahlung von Schafblut nach 24 Stunden in KS CN-suspension und eines entsprechenden Versuchs mit Menschenblut. Der Vergleich zeigt tatsächlich, dass die Röntgenwirkung beim Schafblut etwas stärker ist als beim Menschenblut. Der Unterschied reicht aber keineswegs aus, um die erwähnten Diskrepanzen in den gefundenen Bestrahlungswirkungen zu erklären. Holthusen gibt z. B. an, dass seine Rhodanidsuspension sofort nach Abschluss der Bestrahlung fast vollständig hämolysiert war. Davon ist auch in den hier mitgeteilten Versuchen mit Schafblut keine Rede. Die Frage, warum unsere Ergebnisse quantitativ von denen Holthusens abweichen, bleibt also noch offen.

Diskussion.

Die Versuche über die Anionenaustauschgeschwindigkeit nach Röntgenbestrahlung zeigen, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen eine Verminderung der Anionenpermeabilität nach Bestrahlung nicht nachweisbar ist. Trotzdem kann eine Membranänderung im Sinn einer „Umladung" noch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die osmotische Schwellung ist ja nicht in allen Salzlösungen gleich stark, wie oben gesagt wurde, und gerade in Sulfatlösungen, wie sie bei der osmotischen Untersuchung des Ionenaustausches verwendet werden müssen, ist sie besonders schwach. Ob die unterschiedlichen Wirkungen der verschiedenen Salze reversibel sind, ist noch nicht bekannt. Ist die starke Wirkung von S CN irreversibel, so werden osmotische Austauschversuche nach Vorbehandlung mit S CN die Frage vielleicht entscheiden können, ist sie reversibel, so werden andere Methoden verwendet werden müssen. Als Ergebnis der mitgeteilten Versuche kann also bisher nur festgestellt werden, dass der Nachweis einer Umladung der Erythrocytenmembran durch Röntgenbestrahlung bisher nicht geführt werden konnte.

Eine solche Umladung ist von Mond bei Erythrocyten angenommen worden auf Grund von Versuchen bei verschiedenen pH. Mond glaubte zeigen zu können, dass bei alkalischer Reaktion die Kationenpermeabilität in Anionenpermeabilität umschlägt, was dem Verhalten eines Eiweisses entspricht, das auf der sauren Seite seines isolektrischen Punktes positive, auf der alkalischen negative elektrische Ladung besitzt. Mond machte auch für das analoge Ver-

halten der Erythrocyten ein Membraneiweiss verantwortlich und nahm, da der Umkehrpunkt in seinen Versuchen bei pH 8,3 lag, die Anwesenheit freien Globins in der Membran an, dessen isolektrischer Punkt etwa diesem pH entspricht. Es hat sich aber gezeigt, dass diese Deutung unzutreffend war, indem eine Wiederholung der Mond'schen Versuche in gepufferten Salzlösungen (Mond hatte in Rohrzuckerlösung gearbeitet) zu keiner Umkehr der Ionenpermeabilität (Davson und Danielli) führte. Es ist bis heute kein Beispiel bekannt, bei dem die Membran einer einzelnen Zelle durch irgendwelche Massnahmen das Vorzeichen ihrer Ionenpermeabilität geändert hätte. Vielleicht darf man annehmen, dass eine für die Zelle so wichtige Eigenschaft wie die Ionenpermeabilität durch eine ausreichende Stabilität der zu Grunde liegenden Struktur gegen äussere Einflüsse geschützt sein muss. Bei Zellverbänden, wie etwa der Froschhaut, sind Umladungen bei Aenderung des pH bekannt (Amberson und Klein), jedoch ist es keineswegs sicher oder auch nur anzunehmen, dass dabei die Ionenpermeabilität der Epithelzellen ihr Vorzeichen wechseln würde. Die Umladung ist in diesem Fall auf elektrometrischem Wege gezeigt worden und der elektrische Strom nimmt bei solchen Versuchen seinen Weg im wesentlichen zwischen den Zellen und nicht durch die Zellmembranen hindurch, so dass Schlussfolgerungen auf die Permeabilität der Zellen selbst aus solchen Versuchen (dasselbe bezieht sich auf bisweilen missdeutete Diffusionsversuche an Muskelmembranen) unzulässig sind.

Der Nachweis, dass die verschiedenen Salze ihre Wirkung hauptsächlich in der Nachperiode entfalten, zwingt zu einer Revision der Vorstellungen über den Mechanismus der Salzwirkungen. Holthusen nahm an, dass die Salze den Kolloidzustand des Protoplasmas und damit seine Strahlensensibilität beeinflussen. Die hier mitgeteilten Versuche zeigen, dass im Gegensatz zu dieser Auffassung die Hauptwirkung der verschiedenen Salze zweifellos nicht in der Bestrahlungsperiode selbst, sondern in der darauf folgenden Nachperiode sich abspielt. Es ist zwar nicht ausgeschlossen, dass die Bestrahlungszeit selbst auch sensibel für Salzwirkungen ist, jedoch ist diese Frage erst in weiteren, speziell für ihre Entscheidung anzulegenden Versuchen zu prüfen. Jedenfalls zeigen die hier mitgeteilten Versuche eine sehr ausgesprochene Wirkung der Salze in der Nachperiode. Worin diese Wirkung besteht, soll erst nach etwas eingehender experimenteller Bearbeitung diskutiert werden. Dagegen sei schon kurz auf folgendes hingewiesen. Es zeigt sich, wie schon erwähnt, dass auch in den unbestrahlten Suspensionen in Kaliumrhodanidlösung eine gewisse osmotische Schwellung zu beobachten ist, die dann allerdings beim bestrahlten Blut noch erheblich verstärkt wird. Die Wirkung der Salze und der Röntgenbestrahlung sind daher offenbar gleich gerichtet. Das legt die Vermutung nahe, dass die starke Hämolyse bestrahlten Blutes in Rhodanidlösung nicht so zu deuten ist, dass die Rolle des Salzes nur die eines Sensibilisators wäre, sondern dass sich hier offenbar zwei gleichgerichtete Wirkungen, die des Salzes und

die der Bestrahlung addieren. In einer späteren Arbeit wird auf diese Annahme zurückzukommen sein.

In diesem Zusammenhang sind auch die Untersuchungen von Höber über Spontanhämolyse in verschiedenen Salzlösungen von Interesse, die noch weiter zurückliegen, als die Holthusenschen Versuche. Höber stellte Blutsuspensionen in verschiedenen Salzlösungen her und beobachtete nach Aufbewahrung im Eisschrank durch mehrere Tage die spontan eintretende Hämolyse. Er fand dabei ganz ähnliche Salzreihen wie später Holthusen bei der Röntgenhämolyse, was mit der hier gemachten Annahme gleich gerichteter Wirkungen ebenfalls übereinstimmt. Für diese Versuche verwendete er nun hypotonische Salzlösungen, offenbar weil sie deutlichere Hämolyse ergaben als isotonische. Das wird nun aus der osmotischen Natur der Hämolyse verständlich, für die ja der höhere Hämolysegrad bei Hypotonie bezeichnend ist.

Die Abweichungen unserer experimentellen Befunde von denen Holthusens bleiben, nachdem die Prüfung des Schafblutes keinen entsprechenden Unterschied in der Empfindlichkeit gezeigt hat, ungeklärt und müssen in weiteren Versuchen analysiert werden. Es sei jedoch jetzt schon darauf hingewiesen, dass in den Holthusenschen Versuchen Kontrollangaben über unbestrahltes, jedoch sonst in der gleichen Weise behandeltes Blut fehlen, sodass aus seinen Versuchen nicht mit Bestimmtheit hervorgeht, wie viel von den mitgeteilten Wirkungen tatsächlich der Bestrahlung zuzuschreiben ist.

Zusammenfassung.

Die von Burgener begonnene Untersuchung der Röntgenhämolyse wurde fortgeführt. Es wurde geprüft, ob die Permeabilitätsänderung nach Röntgenbestrahlung, derzufolge die Zellen Kationen-permeabel werden, auf einer Umladung der Membran beruht, d. h. ob die Anionenpermeabilität dabei abnimmt. Eine solche Abnahme konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Eine endgültige Entscheidung der Frage steht aber noch aus. Die von Holthusen beschriebene Abhängigkeit des Bestrahlungseffektes von der Salzlösung, in der das Blut suspendiert ist, wurde näher untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Hauptwirkung des Salzes nicht in der Bestrahlungsperiode, sondern in der Nachperiode zu suchen ist. Man erhält qualitativ die gleichen Salzwirkungen, wenn man das Blut erst nach der Bestrahlung auf verschiedene Salzlösungen verteilt, anstatt es in diesen Lösungen zu bestrahlen. Auch quantitativ sind die Wirkungen ähnlich.

Schliesslich wurde geprüft, ob das von Holthusen verwendete Schafblut gegen Röntgenstrahlen empfindlicher ist als Menschenblut. Dies bestätigte sich; der Unterschied reicht jedoch nicht aus, um die quantitativen Unterschiede zwischen den Holthusen'schen Angaben und unseren Ergebnissen zu erklären.

Es bleibt mir noch die angenehme Pflicht, den Herren Professoren Liechti und von Muralt meinen Dank auszusprechen für die liebenswürdige Ueberlassung des nötigen Materials, sowie Herrn Dr. Wilbrandt für seine Mithilfe und sein ständiges Interesse.

Literatur.

H. Holthusen, Fortschr. Röntgenstr. 29.777 (1922).
A. Liechti, Röntgenphysik, Berlin, 1939.
W. Wilbrandt, Pflüg, Arch. ges. Physiol. 241, 289 (1938).
Amberson u. Klein J. Gen. Physiol. 11, 823, 1928.
H. Davson u. J. F. Danielli, Biochem. J. 30, 316, 1936.
R. Höber, Bioch. Zs. 14,209, 1908.
R. Mond, Pflüg. Arch. Physiol. 217, 308, 1927.